

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	A biochemical study on the site-specific recombinase XerA from the archaeon Thermoplasma acidophilum
著者(和文)	JoMinji
Author(English)	Minji Jo
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10607号, 授与年月日:2017年7月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岩崎 博史,一瀬 宏,相澤 康則,中戸川 仁,梶川 正樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10607号, Conferred date:2017/7/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

## 論文審査の要旨及び審査員

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	Jo Minji	
論文審査員	氏 名	職 名	氏 名	職 名
	主査 岩崎 博史	教授	梶川 正樹	講師
	一瀬 宏	教授		
	中戸川 仁	准教授		
	相澤 康則	講師		

本論文は「A biochemical study on the site-specific recombinase XerA from the archaeon *Thermoplasma acidophilum*」と題し、6章より構成されている。

第一章「Introduction」では、部位特異的組換えについて概説している。まず、部位特異的組換えが様々な生体内反応に関わることを示し、さらに、部位特異的組換えが様々な遺伝子工学のツールとして利用されていることを例示している。続いて、大腸菌における XerC/D-*dif* 系を概説し、部位特異的組換え系が二量体化した染色体を解消することで環状染色体の分配に必須な働きをしていることを述べ、その反応の分子メカニズムを説明している。すなわち、XerC と XerD の二種類のリコンビナーゼは、複製終結点付近に存在する特異的部位 *dif* で組換えを起こすことで、致死となる二量体染色体を通常の単量体に変換する。この際、FtsK タンパク質が補助因子として働くこと等を説明している。続いて、アーキアにおける二量体染色体解消機構の知見を紹介している。アーキアではリコンビナーゼとして XerA の一種類しか存在せず、FtsK 様タンパク質も同定されていないことから、大腸菌における知見をそのまま適応できず、アーキアにおける二量体染色体の単量体化機構の詳細は不明であることを述べ、アーキア *Thermoplasma acidophilum* を用いた本研究の意義を明確にしている。

第二章「Materials and methods」では、本研究で用いた実験手法と実験材料の詳細を述べ、他の研究者による追試実験を可能にしている。

第三章より五章では得られた結果を3つの章に分割して述べている。まず、第三章「Identification of XerA-binding site(s) on the *T. acidophilum* genome」で、*T. acidophilum* 染色体上の XerA 結合部位を ChIP-seq 法により高解像度に決定し、2箇所の結合部位を同定している。ChIP-qPCR 法により XerA 結合について定量的に確認した後、それぞれ *peak1* と *peak2* と命名した。次に、それぞれの結合領域を含む約 1.5 kb を持つプラスミドの二量体を用意し、これらを基質として精製した XerA リコンビナーゼの部位特異的組換えについて試験管内再構成系実験を行い、*peak2* を含む DNA 領域のみが二量体環状 DNA の単量体化反応における XerA の基質となることを示している。

第四章「XerA-mediated dimer resolution *in vitro*」では、既報のアーキア *dif* 配列との比較から、*peak1* と *peak2* 領域に、それぞれ *dif1* (27bp)、及び、*dif2* (28bp) と命名したコンセンサス配列を見出し、これらの配列をプラスミドにクローニングした環状 DNA を基質として試験管内部位特異的組換え反応を行い、*dif2* 配列のみがターゲット部位として機能することを確かめている。*dif* 配列は、6ヌクレオチドのスペーサーを介して左右 11ヌクレオチドの偽回文配列構造をしている。特に、左右のアーム配列のスペーサーに近い5ヌクレオチドは、種間の保存性も高いことから、重要な配列であると予想されるが、この部位に11種類の変異を導入した *dif2* プラスミドを構築して、部位特異的組換え能を解析し、これらが本反応に重要な残基であることを確認している。

第五章「Molecular mechanism of XerA-mediated recombination」では、*dif2* 配列の左右のアームを分割して、*trans* の DNA 鎖転移反応を解析し、XerA による部位特異的組換え反応は 3'-リン酸化チロシン-DNA 複合体を中間体とするトランスエステル交換反応を素過程とすることを示している。さらに、*dif2* 全長、及び、アーム部分に対する多数の置換変異体を用いた結合実験から、XerA の基質認識機構を詳細且つ緻密に解析している。その結果、スペーサーの両脇に存在する保存された配列に加えて、アームに存在するいくつかの重要なヌクレオチドを提示している。これらの結果をもとに、XerA タンパク質一分子が最初に左アームに結合し、次に2個目の XerA が右アームに結合して初期複合体を形成し、この XerA-*dif2* 初期複合体が二量体化することで部位特異的組換えが進行する反応機構モデルを提唱している。さらに、*dif1* 配列が組換えを起こさない理由として、右アームにチミンからシトシンの置換とスペーサーが5ヌクレオチドであることを指摘し、これを試験管内組換え反応によって実験的に検証し、報告している。

第六章「Discussion」で、結果を総括してかつ考察を述べている。そのなかで、多くのアーキアゲノム上には、活性型の *dif* 配列に加えて、組換え活性を保持していないと予想される *dif1* 様の配列が存在することを指摘し、これら2つの配列と複製起点と複製終結点との相対的な位置が保存されていることから、XerA が *dif1* 様配列に結合することで、二量体染色体の単量体化反応の制御に関わる可能性を示唆している。

以上を要するに、本論文はアーキア*T. acidophilum*のXerAの*dif2*部位における部位特異的組換え機構の詳細を明らかにし、アーキアにおける二量体化した染色体の単量体化による染色体分配の分子メカニズムにおいて新しい重要な知見を提示したものであり、理学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。